

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Prof. Dr. med. P. Klein

DIE BEEINFLUSSUNG DER PHOSPHATASEAKTIVITÄT (SAURE PHOSPHATASE)
VON STAPHYLOKOKKENSTÄMMEN DURCH
SALZE VON 8-C1-THEOPHYLLIN UND DURCH PFLANZLICHE WUCHSSTOFFE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

HANS-JOACHIM GILFRICH

aus Monsheim



MAINZ 1963

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. K. Lang
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. G. Gillissen
Korreferent:	Prof. Dr. med. P. Klein
Tag der mündl. Prüfung:	27. Mai 1963

INHALT

1. Einleitung und Ziel der Arbeit

EIGENE VERSUCHE

2. Material und Methoden

3. Besprechung der Ergebnisse

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literatur

1. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

In der Literatur gibt es nur wenige Hinweise über die Beeinflussung von pathogenen Mikroorganismen durch pflanzliche Wachstumsstoffe. Gelegentlich wurde über eine Wachstumshemmung oder Stimulierung von Diphtheriebakterien durch verschiedene Pflanzenhormonpräparate berichtet (Medgyesi, Koller und Katona). Indolylessigsäure wirkt gegen gramnegative Bakterien, Mykobakterien sprechen auf Indol-3-propionsäure an (Dubos) (Übersicht über pflanzliche Wachstumsstoffe s. Audus). Es sollte untersucht werden, inwieweit solche Stoffe einen Einfluß auf die Phosphataseaktivität von Staphylokokken mit verschiedener Penicillin (Pc)-Resistenz haben. Diese Frage war insofern von Interesse, als die Pc-Resistenz von Staphylokokken korrelationsstatistisch gesichert in direkter Beziehung zur Phosphataseaktivität steht (Gillissen). Da überdies Salze von Theophyllin in der Lage sind, die Pc-Resistenz von Staphylokokken zu mindern (Gillissen und Storbeck), sollte untersucht werden, ob sich auch die Phosphataseaktivität ändert.

2. MATERIAL UND METHODEN

A. MATERIAL

1) Bakterienstämme

Als Versuchsstämme dienten:

3 Stämme von *M. pyogenes* var. *aureus*, und zwar

a) der Pc-sensible Stamm Sg. 511

b) der pathogene Pc-resistente Stamm *M. pyogenes* var. *aureus* 431. Dieser Stamm bildete wie alle Pc-resistenten Staphylokokkenstämme Penicillinase.

c) der Pc-resistente Stamm *M. pyogenes* var. *aureus* 40. Dieser Stamm wurde gewonnen durch Züchtung in täglichen Passagen mit steigendem Pc-Gehalt. Diese dabei durch Selektion erhaltenen Pc-resistenten Staphylokokkenstämme bilden, wie auch der Stamm 40, keine Penicillinase.

2) Testsubstanzen

Als Testsubstanzen dienten folgende Stoffe:

a) Salze des Theophyllins

Na-8-chlor-theophyllin (TCl 1)

Triäthylammonium-8-chlor-theophyllin (TCl 2)

N-Methylglutamin-8-chlor-theophyllin (TCl 4)

8-Brom-theophyllin (TCl 9)

8-Jod-theophyllin (TCl 13)

Alle diese Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst.

b) pflanzliche Wuchsstoffe

Acidum phenylaceticum purum (PE)

E. Merck, Darmstadt

o-Chlorophenoxy acetic acid (o-CPA)

L. Light, Altona

p-Chlorophenoxy acetic acid (p-CPA)

L. Light, Altona

α -Naphtalene acetic acid (α -Na)

L. Light, Altona

3-Indolye acetic acid (3-Iaa)

L. Light, Altona

γ -(3-Indolye) n-butyric acid (γ -INB)

L. Light, Altona

6-Mercaptopurin (6-MP)

L. Light, Altona

4-Aminopteroylglutaminsäure (4-AG)

L. Light, Altona

Colchicin krist. (Col)

Karl Roth, Karlsruhe

Carbaminsäureäthylester, Äthylurethan (U)

E. Merck, Darmstadt

Außer den vorgenannten Testsubstanzen wurden noch 2 Metallsalze benutzt, um die Frage nach der Ursache einer Hemmung der Phosphatase-aktivität durch die TCl-Salze abzuklären.

Zur Verwendung kamen:

Zincum aceticum

Magnesiumcitrat

E. Merck, Darmstadt

Auch diese Substanzen wurden in sterilem Aqua dest. gelöst, und die Lösungen mit dem pH-Meter auf Neutralität eingestellt.

Da für die Versuche die Lösungen keimfrei sein mußten, wurden sie durch Porzellanfilterkerzen steril filtriert.

B. METHODEN

1) Antibakterielle Wertigkeitsbestimmung

a) Bestimmung der Penicillin-Resistenz

Zur Bestimmung der Sensibilität der Teststämme wurden die Dilutions-tests mit geometrischen Verdünnungsstufen benutzt.

200.000 IE Penicillin-G-Natrium wurden mit 10 ml sterilem Aqua dest. in der Stechampulle gelöst und unter streng sterilen Bedingungen auf die erforderlichen Anfangskonzentrationen mit sterilem Aqua dest. verdünnt.

Saccharosebouillon mit Lackmuslösung diente bei den ersten Verdünnungsreihen als Indikatornährlösung.

Auf 10 ml Bouillon kamen dazu 0,3 ml Lackmuslösung.

Die zunächst violette Farbe schlug unter dem Einfluß der wachsenden Keime durch Verschiebung des pH-Wertes nach dem sauren Bereich ins Rote um.

Diese Nährlösung wurde beimpft im Verhältnis 1 : 100 mit einer 18 Std. alten Bouillonkultur.

In jedes der 10 Röhrchen einer Reihe wurde 1 ml der Keimbouillon steril pipettiert.

In das jeweils erste Röhrchen dieser Reihe wurde 1 ml Pc-Lösung gegeben, der die doppelte Menge der gewünschten Anfangskonzentration enthielt, und dann mit einer sterilen Pipette durchpipettiert, um die erforderliche Verdünnung im Sinne einer geometrischen Reihe (1 : 2 : 4 : 8 : 16 usw.) zu erhalten.

Als Anfangskonzentrationen wurden für Sg.511 1 IE Pc/ml, für Stamm 40 500 IE Pc/ml und für Stamm 431 10.000 IE Pc/ml gewählt.

Nach 24-stündiger Aufbewahrung im Brutraum bei 37°C wurde die Resistenz der einzelnen Stämme abgelesen und zur Kontrolle der Reinheit ein Ausstrich der bewachsenen Röhrchen auf einer Agarplatte gemacht.

Als Resistenz wurde das Mittel der Pc-Konzentration zwischen der des letzten nicht bewachsenen und des ersten deutlich bewachsenen Röhrchens angegeben.

b) Bestimmung der bakteriostatischen Grenzkonzentration der Testsubstanzen

Da die Fermentversuche mit einer subbakteriostatischen Dosierung der Testsubstanzen ausgeführt werden mußten, wurde die bakteriostatische Grenzkonzentration anhand einfacher Verdünnungsreihen bestimmt.

Hierzu wurde eine einfache Bouillon als Nährboden verwendet.

Als Kriterium des Wachstums diente die nach 20-stündiger Bebrütung feststellbare Trübung. Der Ablauf war sonst der gleiche wie bei den oben beschriebenen Verdünnungsreihen, mit der Einschränkung, daß anstelle des Penicillins die Testsubstanzen traten.

c) Kombinierte Verdünnungsreihen gegen Penicillin und Testsubstanzen

Um eine Änderung der Phosphataseaktivität durch die Testsubstanzen evtl. auf eine Erhöhung oder Verminderung der Chemoresistenz zurückführen zu können, mußten kombinierte Dilutionstests mit Pc und den oben angegebenen Testsubstanzen angesetzt werden.

Die Pc-Zugabe wurde wie bei den einfachen Pc-Dilutionstests gehandhabt, also mit Konzentrationsgefälle in geometrischer Reihe bei 10 Röhrchen.

Die Konzentration der Testsubstanzen dagegen war in allen Röhrchen einer Reihe gleich groß, und zwar wurde für jede Testsubstanz eine Reihe mit einer hohen, aber nicht bakteriostatisch wirksamen (dabei wurden die Ergebnisse der einfachen Verdünnungsreihen berücksichtigt) Konzentration und einer noch kleineren Konzentration der Testsubstanz angesetzt.

Es wurde also zunächst 1 ml Keimbouillon steril in ein Reagenzglas pipettiert, dazu 0,5 ml Testsubstanzlösung in der vierfachen Höhe der gewünschten Endkonzentration gegeben.

Der Inhalt wurde mit 0,5 ml Pc-Lösung auf 2 ml ergänzt.

Dabei war es wichtig, daß das Pc schon vorher in geometrischer Reihe herunterverdünnt wurde, da die Impfdosis der Keime in jedem Röhrchen annähernd gleich gehalten werden sollte.

Auch hier wurde nach 24 Stunden die Chemoresistenz bzw. Chemosensibilität, wie oben beschrieben, abgelesen.

2) Phosphatasebestimmung

a) Vorbereitung der Keime

Zur Vorbereitung der Phosphataseversuche wurden die Keime von Schrägagar auf einfache Bouillon überimpft und 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Dann wurde die Keimbouillon 1 : 100 verdünnt und erneut mit einer Platinöse auf einfache Bouillon überimpft.

Nach 16-stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Keime mikroskopisch gezählt und mit Bouillon auf 1×10^6 Keime/ml eingestellt.

Eine ausreichende Menge dieser Keimsuspension wurde 4 1/2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Zu erwähnen bleibt, daß für den langsam wachsenden Sg.40 diese Bedingungen etwas geändert werden mußten, um eine genügende Menge Keime zu gewinnen, ohne mit zu großen Kulturvolumina arbeiten zu müssen. Die Keimzahl wurde in diesem Fall auf 1×10^7 Keime/ml eingestellt und die Inkubationszeit im Bedarfsfalle auf 5 1/2 Stunden verlängert.

Die Zellen wurden dann in der Kühlzentrifuge bei 3.700 U/min zentrifugiert und darauf mit sterilem Aqua dest. gewaschen. Das Sediment wurde jetzt mit sterilem Aqua dest. aufgenommen und, während die Keimsuspension bei 0°C (Eiswasser) aufbewahrt wurde, mikroskopisch ausgezählt und mit Aqua dest. auf $2,5 \times 10^9$ Keime/ml eingestellt.

b) Mikroskopische Zählung

Die Bestimmung der Keimdichte erfolgte mikroskopisch durch den Mittelwert aus 3 Einzelmessungen. Hierzu wurden die Zellen einer Probe zur Fixierung und Färbung mit einer Mischung aus phys. NaCl-Lösung, Formalin und Methylenblau (auf etwa 150 ml NaCl-Lösung 5 ml Formalin und etwas Methylenblau in geeigneter Menge) verdünnt und die Zellzahl mit der Thoma-Zeiss-Zählkammer, die eine Felderung von 16 großen Quadraten mit je 16 kleinen Quadraten aufweist, bestimmt.

5 dieser großen Quadrate wurden ausgezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zellkonzentration errechnet.

c) Herstellung der Eichkurve für die Phosphatasebestimmung

Zum Nachweis der sauren Phosphomonoesterase diente als Substrat p-Nitrophenyl-Dinatrium-phosphat (NPP, Light, Hamburg-Altona, Mole-

kulargewicht 262,66). Die für die Versuche erforderliche Lösung war stets 0,01523 m, die mit 4 g NPP auf 1 l Aqua dest. hergestellt wurde. Unter dem Einfluß der Phosphatase bildet sich durch Hydrolyse p-Nitrophenol, dessen Konzentration ein Maß für die freigesetzte Phosphatase bedeutet. p-Nitrophenol läßt sich, da es in alkalischem Milieu eine intensive gelbe Farbe zeigt, bei 405 m μ sehr gut photometrisch auswerten. Benutzt wurde dazu das Eppendorf-Photometer, Photozelle 90 b, sowie Küvetten mit einer Tiefe von 20 mm.

Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden verschiedene Konzentrationen von p-Nitrophenol hergestellt, die in der nachfolgend beschriebenen Weise mit Puffer usw. versetzt wurden, so daß, wie bei den einzelnen Versuchen, ein Endvolumen von 10,5 ml zustandekam.

Auf der Abszisse wurde, da stets mit gleichen Volumina gearbeitet wurde, die Gesamtmenge p-Nitrophenol pro 10,5 ml angegeben.

Photometriert wurde gegen einen Leerwert, der sich gegenüber der Versuchslösung nur durch das Fehlen von p-NP auszeichnete.

d) Durchführung der Phosphatasereaktion

Jede Phosphatasebestimmung wurde mindestens in doppeltem Ansatz durchgeführt. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- 1,5 ml NPP-Lösung in Aqua dest.
- 2,5 ml Acetat-Puffer pH 5,6
- 1 ml einer Lösung der Testsubstanz
(in der Kontrolle stattdessen 1 ml Aqua dest.)
- 1 ml Keimsuspension mit anfangs 5×10^8 Keimen/ml,
später $2,5 \times 10^9$ Keime/ml
(Leerwert 1 ml Aqua dest. statt 1 ml Keimsuspension)

Kontrollen ergaben, daß diese Ansätze einen pH-Wert von pH 5,6 hatten. Diese Ansätze wurden 30 min im Wasserbad bei 37°C bebrütet (der Stamm 40 ausnahmsweise 60 min, s.o.).

Dann wurde die Reaktion unterbrochen und 0,5 ml einer 0,1 n NaOH bis zur deutlichen Gelbfärbung zugegeben, um die Pufferkapazität des dann zur optimalen Farbentwicklung zugegebenen Glykokollpuffers (von pH 12) nicht zu überlasten.

Das Volumen eines jeden Ansatzes betrug also am Ende des Versuchs 10,5 ml.

e) Der Acetatpuffer wurde wie folgt hergestellt:

11,7 g krist. Na-Acetat
0,79 g Eisessig (96%)
Aqua dest. ad 1000
pH-Wert: pH 5,6

Glykokollpuffer:

Lösung A nach Sörensen:

7,505 g Glykokoll
5,85 g NaCl
Aqua dest. ad 1000

Lösung B:

0,1 n NaOH

460 ml von Lösung A wurden 540 ml von Lösung B zugegeben.
Der pH-Wert betrug pH 12.

f) Photometrische Auswertung

Die Versuchsansätze mit einem Endvolumen von 10,5 ml wurden in der Kühlzentrifuge bei 3.700 U/min zur Entfernung der Bakterienzellen zentrifugiert, um einen Fehler, bedingt durch die Bakterien, bei der photometrischen Bestimmung auszuschalten.

Da die Entwicklung von p-NP außerordentlich stark war, wurde zur Verringerung des Ablesefehlers bei der Erfassung der Extinktionswerte die klare Flüssigkeit des Testansatzes mindestens 1 : 2 vorverdünnt.

Der Verdünnungsfaktor wurde später bei der Angabe des entwickelten p-NP berücksichtigt.

Die Ermittlung des freigesetzten p-NP erfolgte unter Zuhilfenahme der Eichkurve.

3) Bestimmung der Generationszeit

Eine Beeinflussung der Generationszeit wurde nur mit einer besonders interessierenden Testsubstanz untersucht.

Dazu wurde Bouillon mit Sg 511 und dem Stamm 431, ausgehend von

Schrägagarkulturen, beimpft, nach 16-stündiger Bebrütung 1 : 100 mit Bouillon verdünnt und dann mit einer Öse 10 ml Bouillon infiziert.

Nach 14-stündiger Bebrütung bei 37°C wurde nach mikroskopischer Bestimmung der Keimkonzentration die Zelldichte auf 10^6 Keime/ml eingestellt.

Die Testsubstanz (4-AG) war ebenfalls, gelöst in Bouillon, in diesem Ansatz in der Konzentration von 0,1 mg bzw. 0,5 mg/ml enthalten.

Die Kontrolle enthielt kein 4-AG.

Je 20 ml dieser Ansätze wurden im Wasserbad bei 37°C inkubiert, und zur mikroskopischen Bestimmung der Zellkonzentration wurden nach 0 - 30 min - 60 min - 2 Std. - 7 Std. Proben entnommen.

Mit diesen Werten wurden Wachstumskurven angelegt und mit den Zellkonzentrationen zu Beginn und zu Ende der logarithmischen Wachstumsphase die Generationszeiten errechnet.

Dies geschah nach der Formel von Squires und Hartsell:

$$G = \frac{t}{k \times (\log B - \log A)}$$

G = Generationszeit in Stunden

t = $t_2 - t_1$

k = 3,32

A = Keimzahl/ml zum Zeitpunkt t_1

B = Keimzahl/ml zum Zeitpunkt t_2

Die mit dieser Formel erhaltene, in Stunden ausgedrückte Generationszeit wurde in Minuten umgerechnet.

3. ERGEBNISSE

1) Die Penicillin-Resistenz der Teststämme

Da bei *M. Pyogenes* var. *aureus* eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen der Phosphataseaktivität und der Pc-Resistenz besteht (Gillissen und Ruda), war im Hinblick auf die Phosphataseversuche die Resistenzbestimmung der 3 ausgetesteten Stämme von Interesse.

Die Resistenzbestimmungen wurden im Dilutionstest durchgeführt:

mit Sg 511 und den Stämmen 431 und 40, und zwar
in 2 Ansätzen zu verschiedenen Zeiten.
(Ergebnisse s. Tabelle 1 a)

Aus Tabelle 1 a ist zu entnehmen, daß die Pc-Sensibilität des Nicht-Penasebildners Stamm 40 bei 2 verschiedenen Ansätzen stark variiert.

Die unterschiedlichen Ergebnisse mit 431 entsprechen dagegen der üblichen Streuung um knapp eine Verdünnungsstufe.

2) Die Wachstumsbeeinträchtigung der Keime durch die Testsubstanzen

Die benutzten Testsubstanzen sollten untersucht werden auf eine Beeinflussung der Pc-Sensibilität. Deswegen mußte mit subbakteriostatischen Konzentrationen gearbeitet werden.

Im Dilutionstest wurde dann zunächst ein etwaiger bakteriostatischer Effekt aller 10 pflanzlichen Wachstoffsowie der Metallsalze Magnesiumcitrat und Zinkacetat (MC und ZA) mit den Stämmen Sg 511 und 431 untersucht.

Die antibakterielle Wirkung der TCl-Stoffe wurde einer Arbeit von Neubert entnommen (s. Tabelle 1 b).

Die Versuche ergaben, daß sämtliche pflanzlichen Wachstoffsowie selbst in einer Konzentration von 1 mg/ml das Wachstum der beiden Bakterienstämme nicht hemmten.

Dasselbe gilt für MC, während ZA bei beiden Testkeimen in einer Konzentration von 0,5 und 0,25 mg/ml zu einer Bakteriostase führte.

Allerdings kam es bei ZA in dieser Konzentration schon zu einer gewissen Ausfällung der Bouillon. Deswegen wurde bei den späteren Versuchen ZA in einer Konzentration von 0,1 mg/ml benutzt.

3) Die Beeinflussung der Pc-Resistenz durch die Testsubstanzen

Die kombinierten Verdünnungsreihen wurden mit den Wuchsstoffen Colchicin, Urethan, α -Na, p-CPA, o-CPA, Iaa, 6-MP und 4-AG

in 2 Konzentrationen unter Verwendung von
Sg 511 und 431 als Teststämmen

durchgeführt (Ergebnisse s. Tabelle 2 a und b).

Aus Tabelle 2 a und b ist zu entnehmen, daß in den meisten Fällen keine oder zumindest keine wesentliche Änderung der Pc-Sensibilität gegenüber der Kontrolle durch die Anwesenheit der Testsubstanzen verursacht wurde.

Selbst bei sehr hohen Konzentrationen wurde allenfalls eine Abnahme der Pc-Sensibilität in einer Verdünnungsstufe beobachtet, was aber nicht als beweisend angesehen werden kann.

4) Einfluß von Phenyllessigsäure auf die Phosphataseaktivität

Zuerst wurde die zu den pflanzlichen Wuchsstoffen zählende Phenyllessigsäure ausgetestet.

Zur methodischen Abgrenzung erwiesen sich zunächst Vorversuche mit einer verschiedenen Art der Vorbereitung, der Zellzahl, der Versuchsdauer (Tabelle 3 a und b) als notwendig.

Diese Vorversuche wurden nur mit dem Stamm Sg 511 angesetzt.

Jeder Versuch wurde in doppeltem Ansatz gemessen.

Aus den in Tabelle 3 a und b wiedergegebenen Resultaten wurde geschlossen, daß man am ehesten mit verwertbaren Resultaten rechnen kann, wenn man eine Keimkonzentration von $2,5 \times 10^9$ Keimen/ml wählt.

Eine Inkubationszeit für die fermentative Hydrolyse von 30 min erwies sich als ausreichend.

Die endgültigen Phosphataseversuche wurden mit 4 Konzentrationen von PE ausgeführt, d.h. mit der Konzentration von

1 : 10 : 100 : 1000

mit Sg 511, Stamm 40 und Stamm 431 als Testkeimen und jeweils
6 Versuchen (Ergebnisse s. Tabelle 4 a und b)

Aus Tabelle 4 a und b ist zu entnehmen, daß mit zunehmender PE-Konzentra-

tion die Phosphataseaktivität der Stämme Sg 511 und 431 abnimmt. Allerdings sind dann recht erhebliche PE-Konzentrationen erforderlich.

Dieser Effekt ist bei dem Stamm 40 nur unwesentlich vorhanden und dürfte kaum als beweisend anzusehen sein.

Überdies kann aus Tabelle 4 a und b entnommen werden, daß die Phosphataseaktivität bei Betrachtung der Kontrollen bei den beiden resistenten Stämmen, besonders bei Stamm 431, wesentlich größer ist als bei dem Pc-sensiblen Stamm Sg 511. Dieses Ergebnis deckt sich prinzipiell mit den früher beschriebenen Ergebnissen von Gillissen und Ruda.

5) Einfluß der übrigen Wuchsstoffe auf die Phosphataseaktivität

Die Wuchsstoffe	Colchizin
	Urethan
	α -Na
	p-CPA
	o-CPA
	γ -Inb
	4-AG
	6-MP
	Iaa

wurden bei Sg 511 und 431 in 2 Konzentrationen zu 0,5 ml und 0,05 mg/ml auf eine Beeinträchtigung der Phosphataseaktivität geprüft (Ergebnisse s. Tabelle 5).

Die Tabelle zeigt, daß fast alle Essigsäureverbindungen, ähnlich wie die Phenylelessigsäure, zu einer geringen Minderung der Fermentaktivität bei hohen Wirkstoffkonzentrationen führen.

Nennenswert sind diese Aktivitätseinbußen aber nicht.

Im Gegensatz dazu war der Effekt von Urethan und Colchicin invers.

Mit zunehmender Konzentration kam es bei beiden Testkeimen zu einer Erhöhung der Phosphataseaktivität.

Eine Wiederholung dieser Versuche führte zu demselben Resultat.

Zu vermerken ist noch, daß diese Reaktion bei dem Pc-sensiblen Sg 511 ausgeprägter war als bei Stamm 431.

Ferner sei darauf verwiesen, daß mit der kleinen Konzentration von Urethan (50 μ g/ml) bei beiden Teststämmen zunächst eine im Wiederholungsversuch

reproduzierbare Verminderung der Phosphataseaktivität stattfand, die erst bei der hohen Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ über den Ausgangswert anstieg.

Ganz besonders hoch war der konzentrationsabhängige Anstieg der Phosphataseaktivität von 4-AG.

Auch dieses Resultat ließ sich bei einer Wiederholung prinzipiell reproduzieren.

Wegen der unerwartet lebhaften Reaktion in Gegenwart von 4-AG wurde dieser Stoff schon der wachsenden Kultur zugegeben.

Nach 4 1/2-stündiger Bebrütung wurden die Keime gewaschen und nach mikroskopischer Keimzählung auf $2,5 \times 10^9$ Zellen/ml eingestellt.

Im Versuchsansatz wurde jetzt aber kein 4-AG mehr zugegeben. (Ergebnisse Tabelle 6).

Aus Tabelle 6 ist zu entnehmen, daß auch bei diesem Vorgehen die in Gegenwart von 4-AG gewachsenen, später aber gewaschenen Keime eine höhere Aktivität ergaben als die Kontrollkeime.

Allerdings ist der wesentlichste Anstieg bei 50 $\mu\text{g/ml}$ (der kleinen Konzentration) festzustellen, während die hohe Konzentration etwas niedriger, wenn auch erhöhte Werte ergab.

Die starke Phosphataseerhöhung könnte sich natürlich auf eine verstärkte Zellvermehrung zurückführen lassen.

Diese Möglichkeit wurde ausgeschlossen durch Bestimmung der Generationszeit, denn hier zeigen sich bei beiden Stämmen nur geringfügige Abweichungen von der Kontrolle. (Ergebnisse s. Tabelle 9 bzw. Abb. 2 und 3).

Aus Tabelle 9 a und b bzw. Abb. 2 und 3 ist zu entnehmen, daß die Wachstumsgeschwindigkeit durch 4-AG nicht beeinträchtigt wird. Man könnte zumindest bei der höheren 4-AG-Konzentration eher von einer Beschleunigung sprechen.

Die Generationszeit ist also gegenüber der Kontrolle etwas vergrößert.

In diesem Zusammenhang sei auf die in Tabelle 2 a und b wiedergegebenen Resultate verwiesen.

Es konnte dort gezeigt werden, daß die Pc-Resistenz im Dilutionstest in Anwesenheit von 4-AG sowohl bei dem sensiblen Stamm Sg 511 als auch bei dem resistenten Stamm 431 bis zu 2 Verdünnungsstufen zunahm.

Dies paßt recht gut mit früheren Beobachtungen zusammen (Gillissen und Rud a.), wonach die Phosphataseaktivität mit zunehmender Pc-Resistenz ansteigt.

Auffallend ist aber dennoch, daß die an sich grobe Methode des Dilutionstests

ein Ergebnis aufweist, das der Bestimmung der Phosphataseaktivität entspricht.

Bei den früheren Versuchen zwischen Phosphataseaktivität und Pc-Resistenz war das Ergebnis korrelationsstatistisch ermittelt worden.

6) Einfluß der TCl-Salze auf die Phosphataseaktivität

Die Phosphatasebestimmung mit den TCl-Stoffen wurde in jeweils 3 Konzentrationen durchgeführt.

Selbstverständlich durfte die höchste Konzentration nicht bakteriostatisch wirksam sein, sollte allerdings auch nicht allzu weit unter der Grenze der Bakteriostase liegen. Daraus ergibt sich, daß diese Konzentration nicht für alle 5 Substanzen die gleiche sein konnte.

Bei TCl 9 und TCl 13 erschien es sogar zweckmäßig, die Konzentration von Stamm zu Stamm zu ändern.

Es wurden alle 3 Stämme ausgetestet. Die Konzentrationen verhielten sich:

TCl ₁	wie	1 : 4 : 4
TCl ₂	wie	1 : 4 : 4
TCl ₄	wie	1 : 4 : 4
TCl ₉	wie	1 : 4 : 4
TCl ₁₃	wie	1 : 4 : 4

(Ergebnisse s. Tabelle 7 a und b)

Wegen der Eindeutigkeit der Ergebnisse wurde jeweils nur ein Versuch in doppeitem Ansatz durchgeführt.

Auswertung:

Alle Substanzen zeigen eine eindeutige Verminderung der sauren Phosphataseaktivität.

Ein Vergleich des Einflusses der einzelnen Salze ist insofern erschwert, als die verschiedenen Konzentrationen keine genaue quantitative Gegenüberstellung ermöglichen.

Eine solche Gegenüberstellung wäre aber, da es sich um Werte handelt, die in allen Fällen knapp unter der Grenze der Bakteriostase liegen, als Vergleich einander entsprechender Wirkungsintensitäten durchaus denkbar.

Hierbei erweist sich TCl₄ als die am meisten wirksame Substanz. Ein etwas geringerer Wirkungsgrad wird von TCl₁ und TCl₂ erreicht, während TCl₉ und TCl₁₃ bei dieser Betrachtungsweise den geringsten Einfluß auf die Phosphatase haben.

Vergleicht man bei den einzelnen Stämmen die Intensität der fermentativen Hydrolyse unter dem Einfluß der Chemosensibilisatoren, so läßt sich sagen, daß Sg 511 die stärkste und Stamm 40 die geringste Beeinflussung zeigen. Der resistente Penasebildner 431 dürfte etwas zwischen beiden stehen.

Bei allen diesen Versuchen ist zu berücksichtigen, daß die Fehlerbreite bei dieser Versuchsanordnung ziemlich hoch ist.

Dies liegt an verschiedenen Faktoren, wie z. B. daran, daß die Versuche an verschiedenen Tagen angesetzt wurden und daß die Testsubstanzen während des Keimwachstums zugegeben worden waren. Dadurch war es nötig, daß die Keime einer jeden Konzentrationsstufe gesondert gezählt werden mußten. Andererseits ist aber die Konzentrationsabhängigkeit des Effekts außerordentlich deutlich zu ersehen, so daß man ein zufallbedingtes Resultat ausschließen kann.

7) TC1-Substanzen und Komplexbildner

Bei der sehr eindrucksvollen Beeinflussung der Phosphataseaktivität durch die TC1-Substanzen lag die Frage nahe, ob dieser Effekt durch eine Komplexbindung von Metallionen zustandekam.

Deswegen wurde untersucht, ob die Minderung der Phosphataseaktivität durch die TC1-Substanzen aufgehoben wird, wenn Metallionen dem Reaktionsgemisch zugegeben werden. Die Konzentration der Metallsalze betrug bei jedem Ansatz für MC 0,5 mg/ml und für ZA 0,1 mg/ml.

Dann wurden Versuche mit allen 3 Teststämmen sowie mit TC1_4 angesetzt, da diese Substanz die fermentative Hydrolyse am meisten hemmte.

Die Versuche wurden durchgeführt:

- a) Unter Zugabe der Substanzen während der Vorzüchtung von 4 1/2 Stunden.
- b) Unter Zugabe der Substanzen während des Ablaufs der Phosphatasereaktion. (Ergebnisse s. Tabelle 8).

Aus Tabelle 8 ist zu entnehmen, daß durch Zugabe von Magnesium- und Zinkionen der TC1_4 -Effekt nicht aufgehoben wird.

Eine zusammenfassende Darstellung aller Phosphatasebestimmungen ist in Abb. 4 wiedergegeben.

Aus Abb. 4 sind sehr deutlich die oben beschriebenen Beobachtungen ersichtlich.

DISKUSSION

Bei einer Bestimmung der Fermentaktivität mit lebenden Keimen sind eine Reihe von Fehlermöglichkeiten zu berücksichtigen.

Als wesentlichste Fehlermöglichkeit ist Alter und Zahl der Keime zu nennen, wobei unter Keimalter im wesentlichen das Kulturalter zu verstehen ist.

Im Laufe der Entwicklung einer Kultur verläuft das Wachstum in einer bestimmten Kurve. Nur in der log. Wachstumsphase ist damit zu rechnen, daß sich die Keime untereinander etwa gleich verhalten.

Die höchste Phosphataseaktivität wird mit Keimen aus jungen Kulturen beobachtet. Eine ganze Reihe von Vorversuchen ist durchgeführt worden, um die optimalen Versuchsbedingungen festzulegen. Am günstigsten erwies sich dabei die letztlich für die Hauptversuche angewandte Methode.

Eine weitere, nicht unwesentliche Fehlerquelle stellt die mikroskopische Bestimmung der Zellkonzentration dar.

Die Fehlerbreite beläuft sich auch bei sorgsamer Durchführung auf $\pm 10-15\%$. Dies erscheint zunächst sehr hoch. Es ist aber bekannt, daß alle anderen Verfahren zur Definition der Keimdichte, sei es die nephelometrische Methode, sei es über die N_2 -Bestimmung, eine ebenso große Fehlerbreite zeigen.

In unserem Fall war es wünschenswert, in bestimmten zeitlichen Intervallen festzustellen, wieviel einzelne Zellen sich in einer Volumeneinheit befinden, also unabhängig von individuellen Größenveränderungen der Zellen, die unter der Einwirkung mancher Testsubstanzen zustandekommen können.

Die hier berichteten Ergebnisse zeigen aber bei Wiederholungsversuchen recht gleichsinnige Resultate und sind im übrigen in vielen Fällen konzentrationsabhängig.

Danach kann man mit Berechtigung von einer statistischen Bewertungsweise Abstand nehmen.

Ganz auffällig sind die Ergebnisse mit den TC1-Substanzen.

Fast durchweg wurde mit diesen Stoffen die Phosphataseaktivität von Staphylokokkenstämmen verschiedener Pc-Resistenzen wesentlich reduziert.

Durch Zugabe von Zink- und Magnesiumionen wurde dieser Effekt nicht aufgehoben.

Diese Ergebnisse stimmen recht gut überein mit der Beobachtung, daß die TC1-Substanzen resistenzmindernd wirken (Gillissen und Storbeck)

und daß mit abnehmender Pc-Resistent korrelationsstatistisch gesichert auch die Phosphataseaktivität abnimmt.

Da NPP sich in Lösung durch eine mangelnde Stabilität auszeichnet, wurde die Substanzlösung täglich neu angesetzt.

Dadurch ergeben sich natürlich kleine Schwankungen. Paralleluntersuchungen zeigten aber, daß die hierdurch bedingte Fehlermöglichkeit keine Rolle spielt.

ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurden mehrere pflanzliche Wuchsstoffe sowie Colchicin und Urethan. Darüber hinaus wurden noch verschiedene Salze des Theophyllins in die Untersuchung einbezogen.

Bestimmt wurde die Beeinflussung der Phosphataseaktivität bestimmter Penicillin-resistenter Staphylokokkenstämme durch diese Testsubstanzen sowie die Beeinflussung der Generationszeit und der Pc-Resistenz.

Die Versuche ergaben, daß die pflanzlichen Wuchsstoffe mit Ausnahme der 4-Aminopteroylglutaminsäure keinen sehr großen Einfluß auf die Phosphataseaktivität haben.

Die als Ausnahme genannte Substanz bewirkt eine nennenswerte Steigerung der Phosphataseaktivität, verbunden mit einer Resistenzsteigerung gegen Penicillin. Dieser Effekt ist nicht bedingt durch Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit, da die Bestimmung der Generationszeit keine wesentliche Veränderung von G ergab.

Eine gewisse Erhöhung der Phosphataseaktivität bewirkten auch Colchicin und Urethan.

Jedoch war eine Erhöhung der Pc-Resistenz nur angedeutet.

Auffallend war dagegen die ausgeprägte Minderung der Phosphataseaktivität durch die Theophyllinsalze.

Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Magnesium- und Zinkionen nicht aufgehoben.

LITERATUR

Gillissen, G., und M. Ruda:

Z. Hyg., Band 144, S. 401-406 (1958)

Gillissen, G., und W. Storbeck:

Z. Hyg. 146, 552 (1960)

Barnes, E. H., und I. F. Morris:

J. Bact. 73/1, 100 (1957)

Audus, C. I.:

Plant Growth Substances, L. Hill Ltd. London (1959)

Dubos, I.:

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 63, 317 (1946)

Medgyesi, G., M. Koller und K. Katona:

Z. Vit., Hormon- und Fermentforschung 10/5, 368 (1955)

Squires, R. W., und S. E. Hartsell:

J. Bact. 69, 226 (1955)

Neubert, Th.:

Diss. (med. Fakultät), Mainz 1961

Tabelle 1 a

Resistenzbestimmung

Teststamm	Ansatz	mittlere Pc-Sensibilität in E Pc/ml
Sg. 511	a)	0,04
	b)	0,04
40	a)	9,8
	b)	2,4
431	a)	239,0
	b)	187,0

Tabelle 1 b

Der antibakterielle Effekt der Testsubstanzen gegen die Teststämme

a) Die Wirkung von TCI_1

mg/ml TCI_1	20	10	5	2,5	1,25	0,62
Sg 511	±	+	+++	+++	+++	+++
431	±	+	+++	+++	+++	+++
40	-	±	++	+++	+++	+++

b) Die Wirkung von TCI_2

mg/ml TCI_2	100	50	25	12,5	6,2	3,1
Sg 511	-	±	+	+++	+++	+++
431	±	+	+	+++	+++	+++
40	-	-	-	+	+++	+++

c) Die Wirkung von TCI_4

mg/ml TCI_4	143	71,5	35,7	17,8	8,9	4,4
Sg 511	-	±	±	+	+++	+++
431	-	+	+	+++	+++	+++
40	-	-	±	+	+++	+++

d) Die Wirkung von TCI_9

mg/ml TCI_9	50	25	12,5	6,2	3,1	1,55
Sg 511	±	+	+++	+++	+++	+++
431	±	++	+++	+++	+++	+++
40	+	++	+++	+++	+++	+++

e) Die Wirkung von TCI_{13}

mg/ml TCI_{13}	50	25	12,5	6,2	3,1	1,55
Sg 511	±	+	+++	+++	+++	+++
431	+	++	+++	+++	+++	+++
40	++	+++	+++	+++	+++	+++

Tabelle 2 a

Beeinflussung der Resistenz durch die Testsubstanzen
(Testkeime: Staph. 431)

Pc-Konzentration in E Pc/ml

Testsubst.

in μ g/ml	2500	1250	625	312,5	156,25	78,13	39,06	19,5	9,7	4,8	2,4
K		-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
Col 500	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
7,5	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
d-Na 500	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
7,5	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
p-CPA 500	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
7,5	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
o-CPA 500	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
7,5	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
Iaa 500	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
7,5	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
6-MP 500	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
7,5	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
U 500	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
7,5	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++
4 AG 500	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++
50	-	-	-	-	+	++	++	++	++	++	++

Tabelle 2 b

Testkeim: Sg 511

Beeinflussung der Resistenz durch Wachststoffe

Pc-Konzentration in E Pc/ml

Sg 511

Testsubst.

in $\mu\text{g/ml}$	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,0075	0,0037	0,0018
K	-	-	-	-	±	++	++	+++	+++	+++
Col 500	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++
7,5	-	-	-	-	±	++	++	+++	+++	+++
-Na 500	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++
7,5	-	-	-	-	±	++	++	+++	+++	+++
p-CPA 500	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
7,5	-	-	-	-	±	+	++	+++	+++	+++
o-CPA 500	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++
7,5	-	-	-	±	+	++	++	+++	+++	+++
Iaa 500	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	+++
7,5	-	-	-	-	±	+	++	+++	+++	+++
6-MP 500	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++
7,5	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++
U 500	-	-	-	±	++	++	+++	+++	+++	+++
7,5	-	-	-	±	±	+	++	+++	+++	+++
4-AG 500	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
50	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++

Tabelle 3 a

Einfluß der Versuchszeit und der Keimeinsaat
auf die Freisetzung von p.-NP

Sg 511

Versuchsanordnung und Zeit	Keimkonzentr. Keime/ml	PE μ /ml	p.-NP μ (Mittelwert aus 2 Messungen)	a	b	c	d	e	$\bar{x}$
Schrägagar - 16 Std.	$2,5 \times 10^9$	1.000	42,4	36,5	42,4	34,6	45,1	36,2	38,1
Bouillon		100	38,6	42,1	38,6	39,4	42,2	34,2	39,1
- Schrägagar 16 Std.		10	38,0	41,2	38,0	38,0	38,8	37,4	38,6
Inkubationszeit: 30'		1	36,7	40,0	36,7	38,3	41,8	36,5	38,7
PE während der Reaktion		K	38,0	43,5	38,0	41,8	41,2	39,9	40,9
	5×10^8	1.000	6,6	6,0	6,6	6,0			6,2
		100	5,8	7,2	5,8	6,1			6,3
		10	6,6	6,5	6,6	5,4			6,2
		1	6,7	7,3	6,7	5,7			6,5
		K	6,6	6,5	6,6	5,2			6,1

Tabelle 3 b

Einfluss der Versuchszeit und der Keimeinsaat
auf die Freisetzung von p.-NP

SG 511

Versuchsanordnung und Zeit	Keimkonzentr. Keime/ml	PE δ /ml	p.-NP δ (Mittelwert aus 2 Messungen)		
			a	b	$\bar{x}$
Schräggagar - 16 Std.	2,5 x 10 ⁹	1.000	20,9	18,8	19,8
Bouillon		100	19,2	20,5	19,8
- Schräggagar 7 Std.		10	18,9	19,2	19,0
Inkubationszeit: 30'		1	18,8	18,7	18,7
PE während der Reaktion		K	17,1	18,1	17,6

60'	2,5 x 10 ⁹	1.000	36,9		
		100	37,4		
		10	36,0		
		1	37,0		
		K	36,6		

Tabelle 4 a

Phosphataseaktivität unter Einfluß von PE

58. 511

Versuchsanordnung und Zeit	Keime/ml.	P.E ₉₀ /ml.	p.-MP _Y (Mittelwert aus 2 Messungen)	f	$\bar{x}$
Schräggagar → Bouillon	2,5 x 10 ⁹	1.000	20,8	23	26,26
16 Std. → 1:100 →		100	21,3	25	26,56
Bouillon 16 Std. →		10	23,0	24,9	27,2
10 ⁶ Keime/ml. →		1	27,9	22,4	28,2
4 1/2 Std. 37° C (Wasserbad)		K	25,7	24,5	28,8
Inkubationszeit: 30'					
37° C					

Tabelle 4 b

Phosphataseaktivität unter Einfluss von PE

431

Versuchsanordnung und

Keimkonzentr.

P. *Erug*/ml.

p.-NPG (Mittelwert aus 2 Messungen)

Zeit

Keime/ml.

a

b

c

d

e

f

 $\bar{x}$

Schrägagar → Bouillon

2,5 x 10⁹

1.000

41,5

34,2

42,6

39,2

39,5

36,8

36,96

16 Std. → 1:100 →

100

45,0

35

42,6

39,4

40

42,6

40,76

Bouillon 16 Std. →

10

44,4

35

41,8

39,8

42,6

42,8

40,4

10⁶ Keime/ml. →

1

45,8

36,4

42,2

39,4

43,2

41,8

41,46

4 1/2 Std. 37° C

K

45,2

35

43,3

37,6

43,3

40,9

40,9

(Wasserbad)

Inkubationszeit: 30'

PE während der Reaktion

40

Schrägagar → Bouillon

2,5 x 10⁹

1.000

32,1

30,4

26,5

30,5

26,9

28,4

29,1

16 Std. → 10⁷ Keime/ml. →

100

34,6

31

27,1

29

28,1

28,2

29,66

5 1/2 Std. 37° C

10

34

30,9

27,9

30,5

29,8

30,6

30,65

1

32,1

30,6

26,6

29

28,7

28,6

29,26

Inkubationszeit: 60'

PE während der Reaktion

K

31,7

30,5

26,0

29,3

28

30,0

29,58

Tabelle 5

Phosphataseaktivität unter Einfluß der Testsubstanz

(Werte in $\mu\text{g NP/Ansatz}$)

Versuchsanordnung	Stamm	Konzentration d. Testsubst. in mg/ml	Col	U	α -Na	I-aa	p-CPA	o-CPA	y-Inb	4-AG	6-MP
			x	x						x	
Bouillon 16 Std. - 10^6 Keime/ml	Sg 511	0,5	41,15	36,8	29,7	31,2	31,2	26,6	28,2	53,25	27,8
- 4 1/2 Std. 37°C (Wasserbad)		0,05	33,1	30,5	32,0	30,9	31,3	27,6	29,4	48,3	28,4
- $2,5 \times 10^9$ Keime/ml Testsubstanz während der Reaktion		K	33,5	33,5	31,5	31,3	31,3	29,0	29,0	31,3	29,0

Reaktion:	431	0,5	49,4	44,0	38,6	40,2	38,8	42,4	48,1	89	44,9
30'		0,05	45,2	39,6	42,4	40,8	40,3	44,3	47,0	74,5	46,3
		K	42,7	42,3	44,0	38,4	38,4	44,0	47,5	41,2	47,5

für 6-MP gilt statt
0,5 0,082 bzw. 0,0082

x = Mittel aus 2 Versuchen, die zu verschiedenen Zeiten durchgeführt worden sind. Darüber hinaus stellen alle anderen Werte Mittelwerte aus gleichzeitig durchgeführten Doppelansätzen dar.

Tabelle 6

Phosphataseaktivität nach Vorzüchtung der Keime in 4-AG

<u>Teststamm</u>	<u>µg 4-AG in der Vorkultur</u>	<u>µg NP</u>
Sg 511	500	37,6
	50	42,9
	K	34,8
431	500	45,2
	50	52,4
	K	41,4

Tabelle 7 a

Phosphatasebestimmung nach Vorbehandlung der Keime mit TCl-Salzen

(Werte in μg NP/Ansatz)

Versuchsordnung	Testsubstanz	SG 511	Stamm 431	40
Schrägagar $\rightarrow$ Bouillon 16 Std.	TCl ₁ 2 mg/ml	11,8	31,4	24,5
$\rightarrow$ 4 1/2 Std. 37° C	0,5 mg/ml	19,4	35,4	36,6
1 x 10 ⁶ Keime/ml + Testsubstanz	0,125 mg/ml	30,9	35,4	32,2
$\rightarrow$ 2,5 x 10 ⁹ Keime/ml	K	30,6	41,7	33,1
$\rightarrow$ Phosphatasereaktion				
30 min bzw. 60 min bei Stamm 40	TCl ₂ 5 mg/ml	12,6	28,2	30,8
	1,25 mg/ml	17,5	34,7	36,7
	0,31 mg/ml	29,1	45,9	36,8
	K	30,3	41,7	37,6
	TCl ₄ 14,3 mg/ml	0,9	23	25,7
	3,57 mg/ml	13,4	29,3	36,0
	0,87 mg/ml	32,7	33,6	38,2
	K	31,7	46,6	31

Tabelle 7 b

Phosphataseaktivität nach Vorbehandlung der Keime mit TCl-Salzen
(Werte in μg NP/Ansatz)

Versuchsanordnung	Testsubstanz	Konzentr.	SG 511	Konzentr.	431	Konzentr.	SG 40
Schreëgagar - Bouillon 16 Std.	TCl ₉	1 mg/ml	17,5	5 mg/ml	34,2	2 mg/ml	24,9
- 4 1/2 Std. 37° C		0,25 mg/ml	26,5	1,25 mg/ml	33,9	0,5 mg/ml	25,1
1 x 10 ⁶ Keime/ml + Testsubstanz		0,06 mg/ml	25	0,31 mg/ml	39,4	0,125 mg/ml	30,5
- 2,5 x 10 ⁹ Keime/ml	K		25,2	K	41,4	K	30,15
- Phosphatasereaktion							
30 bzw. 60 min bei Stamm 40	TCl ₁₃	1 mg/ml	21,4	5 mg/ml	25,4	2 mg/ml	26,6
		0,25 mg/ml	29,9	1,25 mg/ml	40,9	0,5 mg/ml	28,8
		0,06 mg/ml	26,3	0,31 mg/ml	36,1	0,125 mg/ml	29,8
	K		31,2	K	41,1	K	30,3

Tabelle 8

Der Einfluß von Metallionen auf den TCL-Effekt
(Werte in $\mu\text{g NP/Ansatz}$)

Versuchsanordnung	Stamm	TCL ₄ (3,57 mg/ml)	TCL ₄ + MC	MC (0,5 mg/ml)	TCL ₄ + ZA	ZA (0,1 mg/ml)	K
Bouillon 16 Std. - 10 ⁶ Keime/ml -	SG 511	26,5	21,0	29,7	24,6	31,0	34,0
4 1/2 Std. 37° C -	431	24,4	21,5	40,6	18,8	30,6	47,7
2,5 x 10 ⁹ Keime/ml + Substanz während der Phosphatase-reaktion	40	31,8	28,9	37,1	24,0	30,9	39,1
30 bzw. 60 min bei Stamm 40							
Bouillon 16 Std. -	SG 511	24,5	24,8	29,5	23,3	32,1	34,0
10 ⁶ Keime/ml -							
4 1/2 Std. 37° C	431	30,2	38,5	40,6	29,4	43,4	47,7
+ Substanzen							
- 2,5 x 10 ⁹ Keime/ml	40	33,1	29,4	40,6	27,9	30,6	39,1
30 bzw. 60 min bei Stamm 40 Vorbehandlung:							

Tabelle 9 aDie Generationszeit unter dem Einfluß von 4-AGStamm Sg 511

Versuchsdauer in Std.	mikroskopisch festgestellte Zellkonzentration in Zellen x 10 ⁶ /ml - 4-AG-Konz. in μ g/ml		
	100	50	K
0	8,5	7	9,5
1/2	8,2	6,5	10
1	11	9	10,5
2	16	33	31
3	37	77	95
4	170	170	370
5	850	670	920
6	1.400	1.500	1.600
7	1.500	1.700	1.500

Umgerechnet in Logarithmen:

0	6,9294	6,8451	6,9777
1/2	6,9138	6,8129	7,000
1	7,0414	6,9542	7,000
2	7,2041	7,5185	7,4914
3	7,5682	7,8865	7,9777
4	8,2304	8,2304	8,5682
5	8,9294	8,8261	8,9638
6	9,1461	9,1761	9,2041
7	9,1761	9,2304	9,1761
G (1-5 Std.) in Std.	0,63	0,64	0,61

Tabelle 9 b

Die Generationszeit unter dem Einfluß von 4-AG

Stamm 431

Versuchsdauer in Std.	mikroskopisch festgestellte Zellkonzentration in Zellen x 10 ⁶ /ml - 4-AG-Konz. in μ g/ml		
	100	50	K
0	5,7	8,0	10
1/2	6	6	9,7
1	7,2	8	10
2	15	17	27
3	52	62	77
4	120	140	190
5	320	620	650
6	970	1.200	1.100
7	1.100	1.500	1.200

Umgerechnet in Logarithmen:

0	6,7597	6,9031	7,000
1/2	6,7782	6,7782	6,9868
1	6,8603	6,9031	7,000
2	7,1761	7,2304	7,4314
3	7,7202	7,7924	7,8865
4	8,0969	8,1461	8,2788
5	8,5119	8,7924	8,8129
6	8,9868	9,0792	9,0414
7	9,0414	9,1761	9,0729
G (1-5 Std.) in Std.	0,72	0,63	0,66

Abb. 1 =
RECHNERTE
FÜR GEOMETRISCHEN BESTIMMUNG VON μ -IP

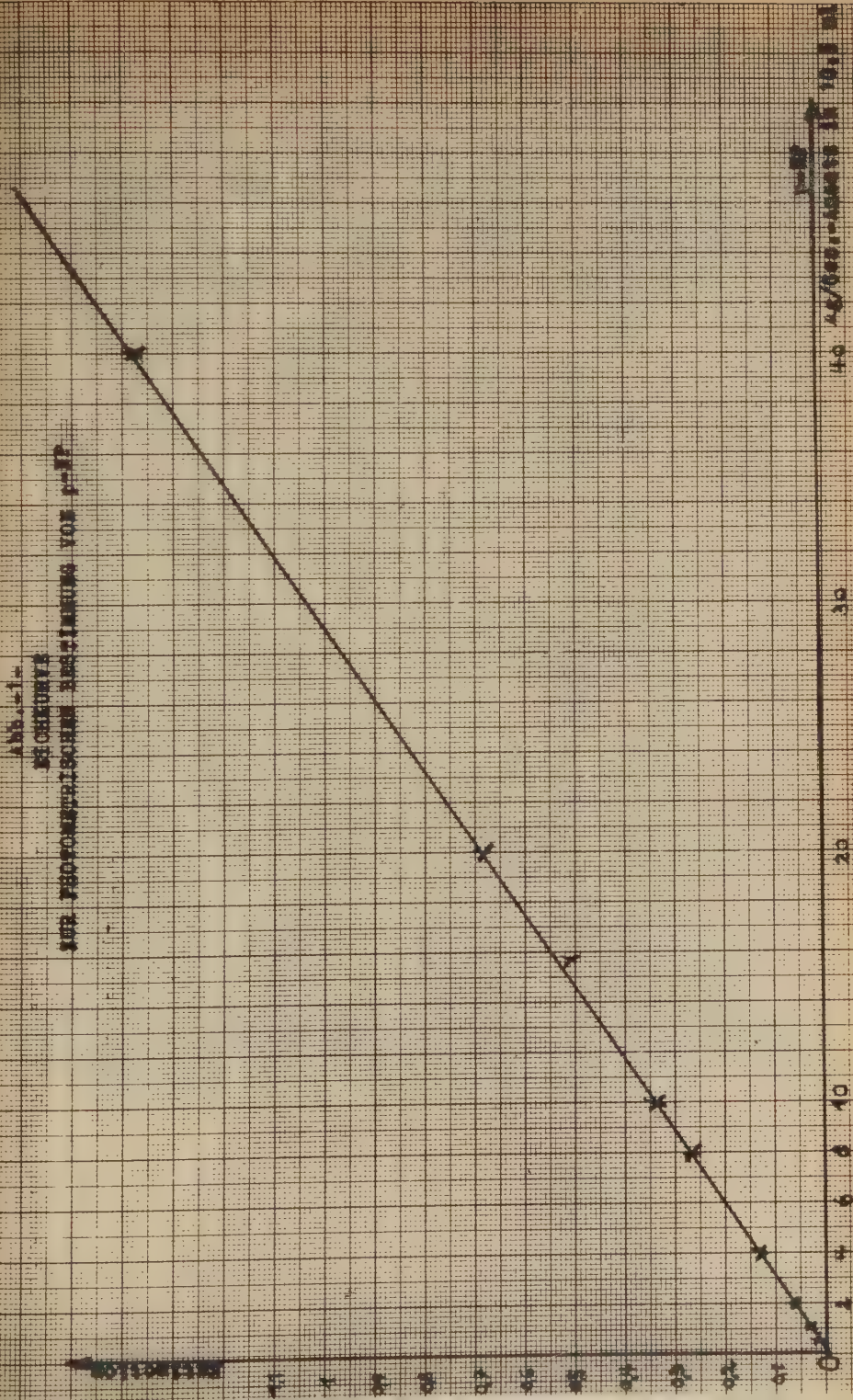


Abb. 2

Wachstumskurve von Sg 511 in Gegenwart von 4-10

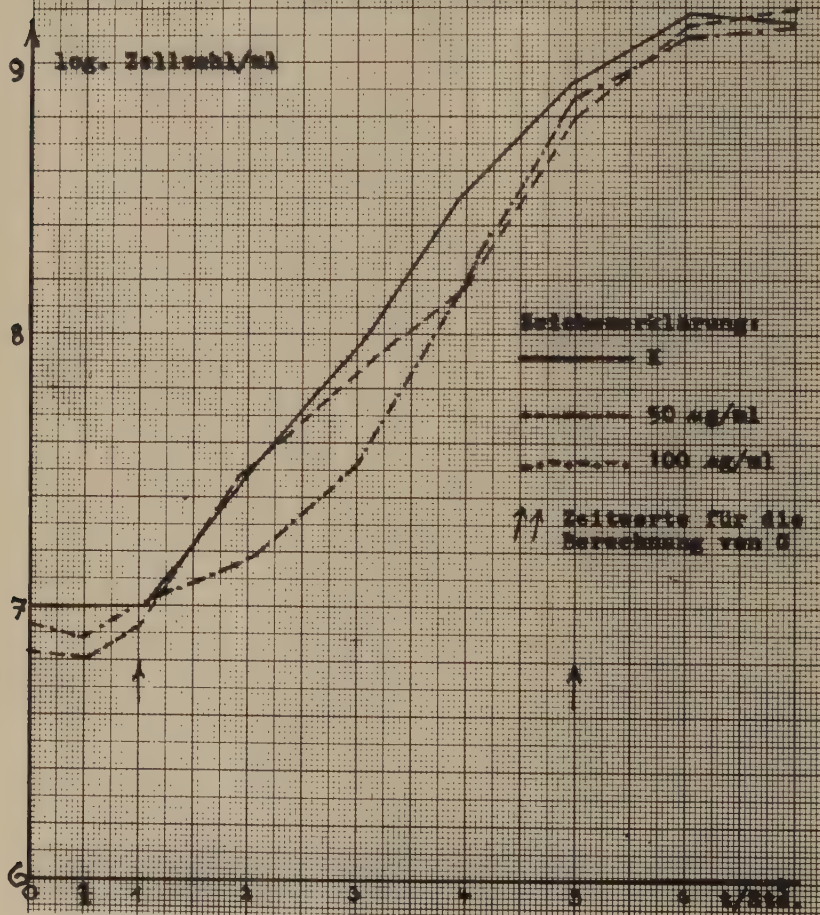


Abb. 3

Reaktionskurve von Stamm 131 in Gegenwart von 4-10

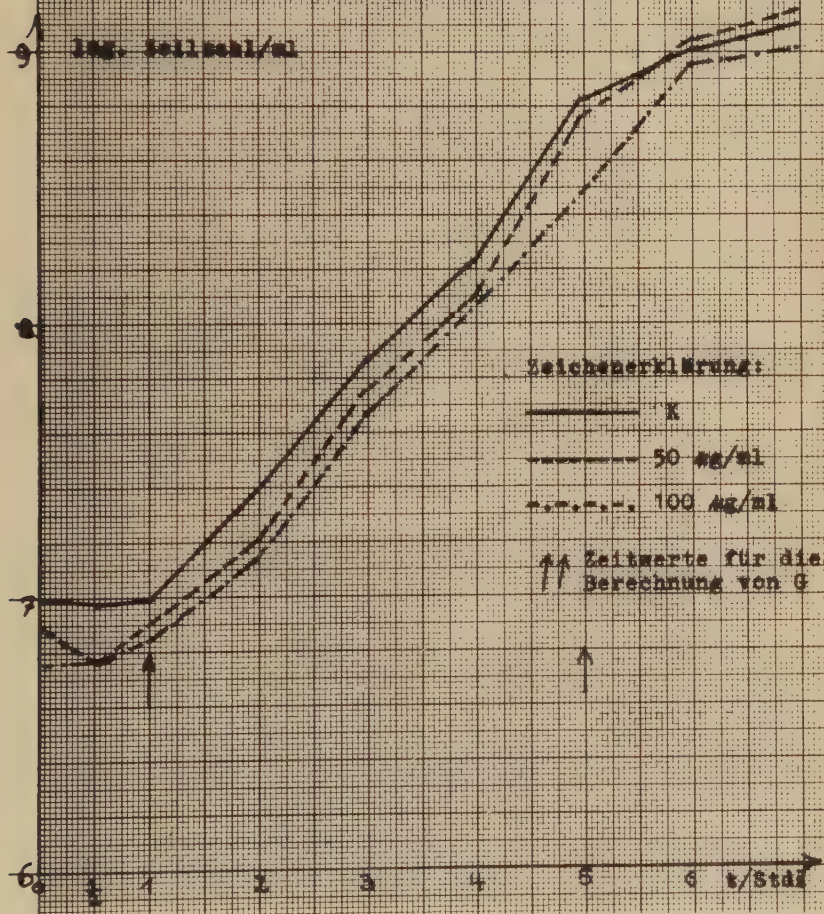


Abb. 4 a

Übersicht über alle Phosphatasebestimmungen

a) Testkeim: Stamm 431

Prozentual-Beziehung der Phosphataseaktivität zu den Kontrollwerten

Testsub- Konz.in

		Übersicht über :			
		=====			
		b) Testkeim			
Testsub- stanz	Konz.in $\mu\text{g/ml}$	Prozentual-Bezi			
		60	50	40	30
PE	1000				
	100				
	10				
	1				
TC1 ₁	2000				
	500				
	125				
TC1 ₂	5000				
	1250				
	310				
TC1 ₄	14300				
	3570				
	870				
TC1 ₉	2000				
	500				
	125				
TC1 ₁₃	2000				
	500				
	125				

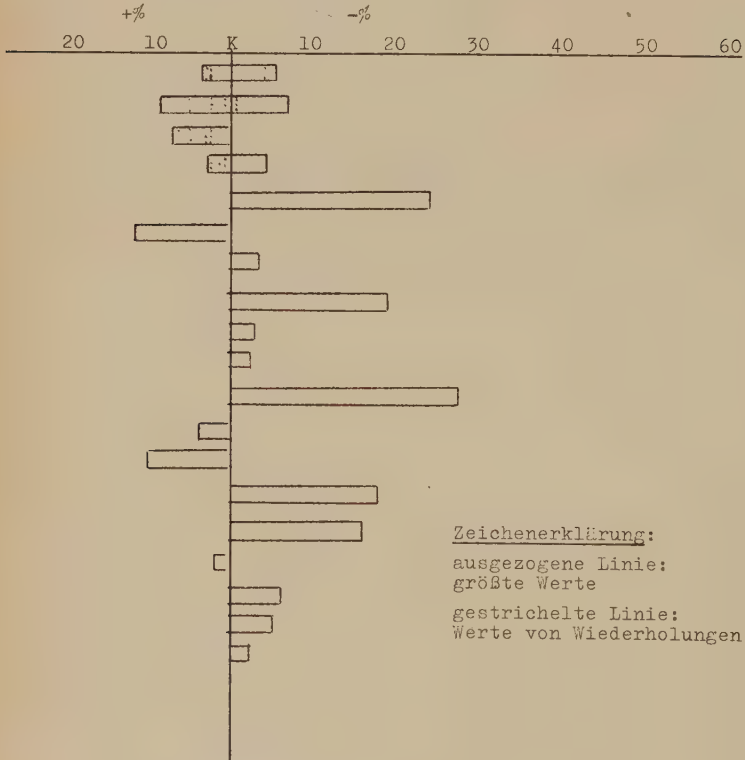
Abb. 4 b

alle Phosphatasebestimmungen

=====

: Stamm 40

ehung der Phosphataseaktivität zu den Kontrollwerten



Übersicht über alle Phosphatasebestimmungen
=====

c) Testkeim: SG 511

Prozentual-Beziehung der Phosphataseaktivität zu den Kontrollwerten

Testsub- Konz.in

LEBENS LAUF

Am 22. Februar 1938 wurde ich in Worms als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Robert Gilfrich geboren.

Nach vierjähriger Grundschulausbildung in der Volksschule zu Monsheim trat ich im Herbst 1948 in das humanistische Gymnasium zu Worms ein, wo ich dann am 1. März 1957 mein Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1957 begann ich dann mein Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz. Nach 5 Semestern absolvierte ich dort das Physikum am 27.10.1959.

Hier führte ich auch mein klinisches Studium fort und schloß es am 22.1.1963 mit dem Staatsexamen ab.

Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent in der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik (Prof. Duesberg) in Mainz.

